

札幌医誌 59 (1) 13~24 (1990)

デアザアデノシンによる X 線潜在的致死損傷修復阻害の 作用機序に関する研究

大久保 整 久保 喜 平

札幌医科大学放射線医学講座 (主任 森田和夫 教授)

The Mechanism of the Inhibition of the Repair of X-Ray-Induced Potentially Lethal Damage by Deazaadenosines

Osamu OKUBO and Kihei KUBO

*Department of Radiology, Sapporo Medical College,
(Chief : Prof. K. MORITA)*

ABSTRACT The effects of deaza-derivatives of adenosine on the repair of the X-ray-induced potentially lethal damage (PLDR) were studied. Postirradiation treatment with 1- and 7-deazaadenosines (C^1 - and C^7 -Ado) effectively suppressed PLDR in plateau-phase HeLa RC-355 cells, while 3-deazaadenosine (C^3 -Ado) had no effect on the repair. Since it has been known that C^7 -Ado is phosphorylated in mammalian cells while C^3 -Ado is not, the significance of the pathway for the PLDR inhibition was studied. The adenosine kinase-deficient variant (355AZA404/TUB-1) of RC-355 cells was isolated and the effect of C^1 -Ado on X-ray PLDR of the cells was tested. It was observed that the drug did not exert any effect on the variant cells. The result indicated that the activity of adenosine kinase is essential for the repair inhibitory effect of the drug.

Further cellular metabolism of the deazaadenosines was investigated by HPLC analysis of the nucleotides in log- and plateau-phase RC-355 cells treated with C^1 -Ado and C^7 -Ado. Analysis showed that these drugs were metabolized into tri-phosphates. Increases in the relative ratios of deazaadenosine triphosphates were observed with increased doses of the drugs. On the other hand, the content of normal ATP was decreased, so that the total amount of deaza-ATP and ATP was constant. The pool size of GTP and UTP remained almost constant within the concentration range tested (10-50 μ M). These results suggest that the deazanucleosides and deazanucleotides are recognized as normal substrates by the adenosine-metabolizing enzymes. However, it has been shown that C^1 -Ado is not metabolized by cellular adenosine deaminase. Since the enzyme is responsible for the intracellular inactivation of a variety of adenosine analogs, C^1 -Ado is expected to be relatively stable in the tissue. In addition, the drug also has properties, such as its high water solubility and the low cytotoxicity, which make it feasible for clinical use. It is concluded that C^1 -Ado is a promising candidate for a prototype of a clinical drug which would improve the efficiency of radiation treatment of malignant tumors.

(Received October 26, 1989 and accepted November 2, 1989)

Key Words: Deazaadenosine, Repair of X-ray damages, Potentially lethal damages,
Phosphorylation

1 緒 言

X 線照射によって生ずる潜在的致死損傷(Potentially

lethal damage: PLD) は, Phillips と Tolmach (1966) により発見され, この発現 (expression) または修復 (PLD repair: PLDR) により細胞の生存率が

変化する¹⁻⁴⁾。接触阻止を受けたり増殖に必須な培地成分の欠乏により増殖を停止した(プラトー期)の培養細胞では、対数増殖期にある細胞より大きなX線PLDRが起こる⁵⁾。このためプラトー期の培養細胞を用いてPLDRの研究が行われるようになった^{6,7)}。近年、動物移植腫瘍においても、X線PLDRが起こることが明らかとなり^{8,9)}、これを特異的に抑制する薬剤の検索やその作用機序に関する研究は、放射線治療成績の向上をはかる上で、重要な意義を持つと考えられる。

これまで、種々の核酸関連化合物のPLDR抑制効果について検討されてきた¹⁰⁻¹⁴⁾。このうち、抑制作用が報告されているものに、アデノシンの誘導体である9- β -D-arabino-furanosyl adenine (ara-A)^{11,14)}、3'-deoxy-adenosine (cordycepin)等がある^{9,12,15)}。これらは、いずれもアデノシンの糖部分を修飾した薬剤である。しかし、これらは生体内では、正常細胞に対し毒性を示す^{16,17)}のみならず、アデノシンデアミナーゼ(EC 3. 5. 4. 4)によって急速に脱アミノ作用を受けて、活性を失ってしまう^{12,16,18,19)}。この問題を克服するために、アデノシンデアミナーゼ阻害剤(2'-deoxycoformycin等)の併用が検討されてきたが、生体内では酵素阻害が、完全に起こらない等^{16,20-22)}、依然として臨床への応用には、問題がある。

ara-Aもcordycepinも、ともに細胞内のアデノシルホモシステイナーゼ(EC 3. 3. 1. 1)を阻害し、その結果細胞内のメチル化を抑制する²³⁻²⁶⁾。そこで、アデノシン誘導体の中から、メチル化抑制作用を有するものに注目して、アデノシンの糖部分でなく塩基部分を修飾した誘導体の中から、PLDR阻害剤を検索することにした。

今回用いたデアザアデノシンは、アデノシンのプリン環の1, 3および7位の窒素を炭素にそれぞれ置換したもの(C¹-, C³-およびC⁷-Ado)である。これらの誘導体は、以下の諸特性に基づいて選択された。すなわちC¹-Adoは、細胞内メチル化およびアデノシンデアミナーゼの抑制作用を持つこと^{25,27,28)}、広い抗ウィルススペクトルを有するC³-Adoは²⁹⁾、細胞内でリン酸化をうけることなく強力に細胞内メチル化を抑制すること^{23,25,30)}、また、C⁷-Adoはメチル化抑制作用は小さい²⁴⁾ながら細胞内にてリン酸化されること³¹⁻³⁴⁾による。本研究では、これら誘導体のうちで、PLDR抑制作用を有するものが見出されたので、その作用の性質および機序について、検討した結果を報告する。

2 材料と方法

2.1 細胞

RC-355: HeLa細胞由来の放射線抵抗性株³⁵⁾
355AZA404/TUB-1: RC-355細胞より得られたアザアデニンおよびツベルシジン耐性株。

2.2 培養方法

細胞は10%牛胎児血清を加えたイーグルMEM培養液中で培養した。細胞は5%炭酸ガスを加えたインキュベーター中で培養して対数増殖期を保持した。

プラトー期の細胞を用いた実験では、対数増殖期の細胞 1.5×10^5 個を、3 cmのプラスチックシャーレにまき、confluentになるまで培養した後、次の2日間は新鮮な培養液にて、更に次の2日間は2 mlの血清を含まない培養液で培養した。実験は細胞を移植後6日目に行った³⁵⁾。

2.3 X線照射

細胞を移植したシャーレを、回転盤上に置き、室温でX線照射を行った。照射装置は、シーメンス社製スタビリペンII(300 kVp, 15 mA, フィルター0.5 mmCu)を使用した。線量率は2.98 Gy/minであった。

2.4 薬剤

使用した薬剤は、アデノシンのヌクレオシドアナログのうち、アデニン部分の1, 3, および7位の窒素を炭素にそれぞれ置換したものである。1-deazaadenine, 1-および3-deazaadenosine (C¹-およびC³-Ado)は、伊藤恵夫博士(北海道大学薬学部)より供与された。7-deazaadenosine (C⁷-Ado)及びアデノシンは、P-Lバイオケミカルより購入した。薬剤は、蒸留水で溶解し、-21℃で保存し、使用直前に無血清培養液を加えて溶解し、使用した。

2.5 生存率

細胞を、照射直後または24時間後に、トリプシン処理し、培養液で希釈して、培養皿中にまいた。照射後10日目に、メタノールで固定し、ギムザ染色し、50個以上の細胞よりなるコロニーだけを、生存として数えた。各図の点は、2回から4回の実験の平均である。標準誤差は平均値の10%以下であった。

2.6 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)用試料の作製³⁶⁾

1) 薬剤処理後の細胞を、EDTA処理し、細胞浮遊液とする。

2) 細胞を遠心し、塩類緩衝溶液(PBS)を用いて洗浄する。

3) 冷トリクロル酢酸(TCA)溶液により、酸可溶

性分画を抽出する。

4) 30 分間遠心する (4°C, 4000 rpm)。

5) TCA を除くために、上清に 2 容のトリオクチルアミン-フロン(1:4, V/V)を加えて、室温で 30 分間混和する。

6) 10 分間遠心する (4°C, 700 rpm)。

7) 水層のみを採取し、試料とする。

2.7 HPLC によるヌクレオチドの分析^{37,38)}

島津 LC-6A システム、カラムは Partisil SAX10 を用いた (移動相: Linear Gradient, 0-100% (45 分), 第 1 移動相: 0.005 M KH_2PO_4 , pH 4.0, 第 2 移動相: 0.25 M KH_2PO_4 , 0.5 M KCl, pH 4.5, 流量: 1.5 ml/min)。

結果はクロマトパック C-R3A (島津製作所) を使用して解析した。

2.8 フローサイトメトリー (FCM)

トリプシン処理により、単細胞浮遊液を作製する。遠心後、沈査を最初、50%, 続いて、70%メタノールにて固定する。PBS による洗浄の後に、RNase (1 mg/ml) にて、37°C で、30 分間処理する。更に PBS にて洗浄し、ヨウ化プロピジウム (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) により、染色する。

細胞周期分布の解析は、EPICS-C (Coulter Electronics Co.) を用いて、おこなった。

3 結 果

3.1 プラト一期における RC-355 細胞の X 線潜在的致死損傷の修復 (PLDR)

Fig. 1 に示すように、細胞を X 線照射 (10 Gy) 後、種々の時間に移植すると、照射-移植間の時間の経過につれて、修復が起り、生存率の増加が観察された。照射直後に移植した場合に比し、照射後 24 時間プラトー状態に維持した後移植した場合では、生存率が約 8 倍増加した。この損傷の修復は、24 時間で完了した。

3.2 プラト一期の RC-355 細胞の X 線 PLDR に対するデアザアデノシンの効果

3.2.1 1-デアザアデノシン (C^1 -Ado) による PLDR 阻害作用。

結果を Fig. 2a に示す。プラト一期の RC-355 細胞に、横軸に示す X 線線量を照射した。照射直後に移植した場合 (0 h) および照射後 24 時間プラトー状態に維持した場合 (24 h) で、生存曲線の parameters を比較すると、extrapolation number は変化なく (約 4), mean lethal dose (D_0) で 1.4 倍, quasithreshold dose (D_q) で 1.6 倍の増加がみられた。照射直後に、毒性を

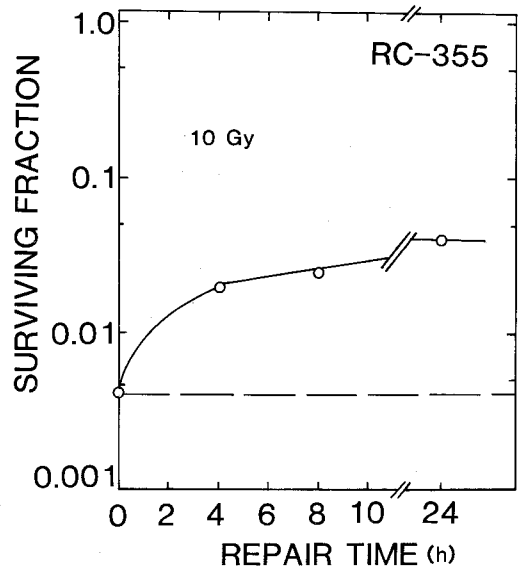


Fig. 1 X-Ray PLDR in the plateau-phase of HeLa RC-355 cells. Survival of RC-355 cells as a function of the incubation time between X-irradiation (10Gy) and delayed plating. About 8-fold increase in the survival was observed during 24 hr as a result of PLDR.

示さない濃度 (10 μM) の C^1 -Ado を加えて、24 時間処理すると、PLDR は完全に抑制された (24 h + C^1 -Ado)。

3.2.2 3-デアザアデノシン (C^3 -Ado) の効果。

10 Gy 照射直後に種々の濃度の C^3 -Ado を加えて、24 時間処理し、その PLDR に対する影響を調べた。 C^3 -Ado は、最高濃度 (100 μM) でも、細胞毒性も PLDR 抑制作用も示さなかった。

3.2.3 7-デアザアデノシン (C^7 -Ado) の効用

同様の実験を C^7 -Ado についても行い、結果を、Fig. 2b に示す。非照射の RC-355 細胞に対する毒性は 2 μM 以上で認められた。照射後 C^7 -Ado 処理 (10 Gy + C^7 -Ado) 群の生存率は、この毒性について補正した値を示す。X 線照射後から 24 時間、各濃度の C^7 -Ado を加えた時、毒性の明らかな濃度 (5 μM) で、PLDR 抑制効果がみられた。

3.3 PLDR に対する 1-デアザアデノシンの効果におけるアデノシンキナーゼの役割

C^3 -Ado は、 N^3 の位置がアデノシンキナーゼ (AK, EC 2. 7. 1. 20) による基質の認識に必須のため²⁹⁾リン酸化を受けることなく、一方、 C^7 -Ado は AK によってヌクレオチドにまで代謝されることが知られている³¹⁻³⁴⁾。そこで、 C^1 -Ado がヌクレオシドおよびヌクレオチドレ

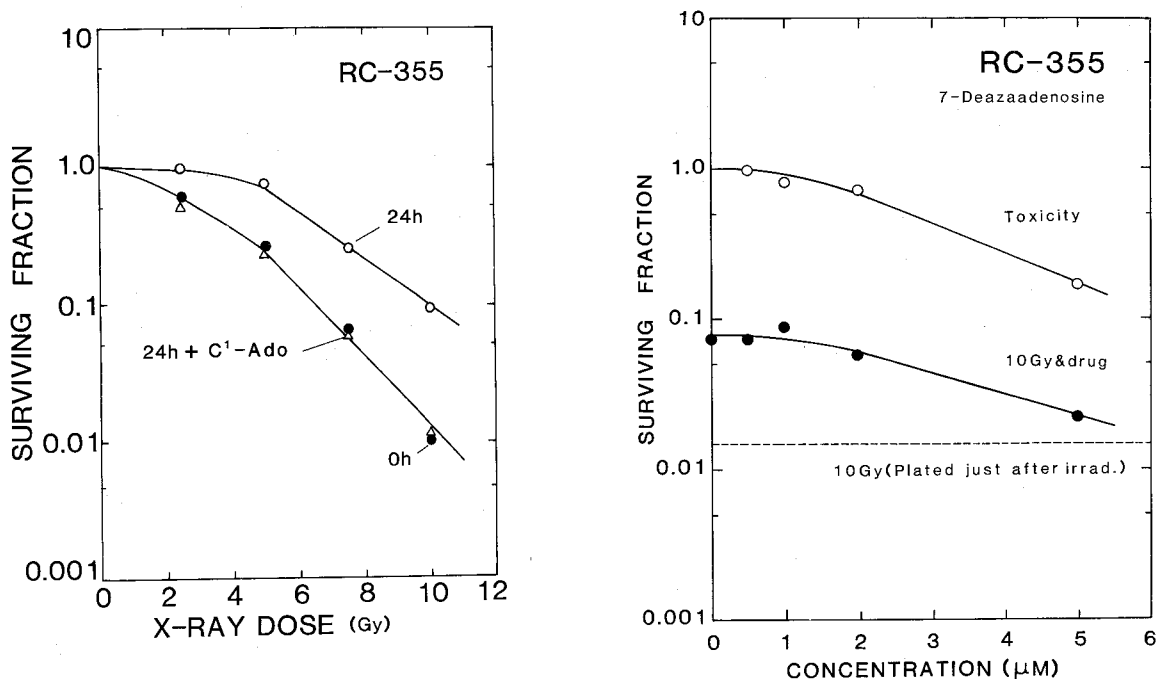


Fig. 2 The effect of deazaadenosines on X-ray PLDR in the plateau-phase RC-355 cells.

a) X-ray survival curves for the cells plated immediately after irradiation (●) and after 24 hr-incubation with (△) or without (○) 10 μM C¹-Ado. b) The plateau-phase cells were irradiated (10 Gy) and incubated for 24 hr in the presence of C¹-Ado at the concentrations indicated (●). The survival was corrected for the cytotoxicity (○) for the non-irradiated cells.

ベルのいずれにおいて PLDR 抑制作用を発揮しているかを知るために、細胞内リン酸化の有無について検討した。

3・3・1 プラトー期の 355AZA404/TUB-1 細胞の PLDR に対する C¹-Ado の効果

C¹-Ado の PLDR 抑制作用における、AK による細胞内リン酸化の意義を調べるために、この酵素活性化を欠く変異株を分離した。もし C¹-Ado のリン酸化が、PLDR 抑制作用に必須であるならば、AK 欠損株の PLDR は、この薬剤によって影響されないことが期待される。Fig. 3a に示す様に、この細胞株では C¹-Ado (10 μM) による PLDR の抑制は認められなかった。このことより、C¹-Ado はヌクレオシドレベルではなく、細胞内でリン酸化されて、初めて PLDR に対する作用を発揮するものと考えられる。

3・3・2 RC-355 細胞に対する 1-デアザアデニン (C¹-adenine) の効果。

Plagmann と Wohlhueter³⁹⁾ は、アデノシンキナーゼ欠損細胞において、アデノシンがアデニンへの分解を経て adenine phosphoribosyltransferase (APRT, EC 2.4.2.7) によりホスホリボシル化される可能性

を示唆している。355 AZA404/TUB-1 細胞は AK のみでなく、APRT をも欠損しているため、C¹-Ado の PLDR 阻害におけるこの酵素の関与を検討するために、C¹-adenine による、プラトー期の細胞の PLDR の阻害の有無を調べた。Fig. 3b に示すように、C¹-adenine (100 μM) による、PLDR の抑制は見られなかった。このことより、C¹-adenine は APRT の基質とはならず、したがって AK 欠損のみが、PLDR の阻害の消失に対し意義をもつと考えられる。

3・3・3 1-デアザアデノシンの PLDR 抑制に対する アデノシンの競合作用。

もし C¹-Ado がリン酸化をうけて PLDR 抑制作用を示すならば、この作用は AK の本来の基質であるアデノシンにより競合されることが期待される。そこで、プラトー期の RC-355 細胞を用いて、種々の濃度のアデノシン共存下の C¹-Ado による PLDR 抑制作用について調べた。結果を Fig. 4 に示す。アデノシンによる細胞毒性は、用いた濃度範囲 (5-100 μM) で、C¹-Ado (10 μM) の存在の有無によらず認められなかった。同一条件のもとで、細胞に 10Gy 照射後、1) 10 μM の C¹-Ado 単独、2) 5-100 μM のアデノシン単独、および 3) 両者の

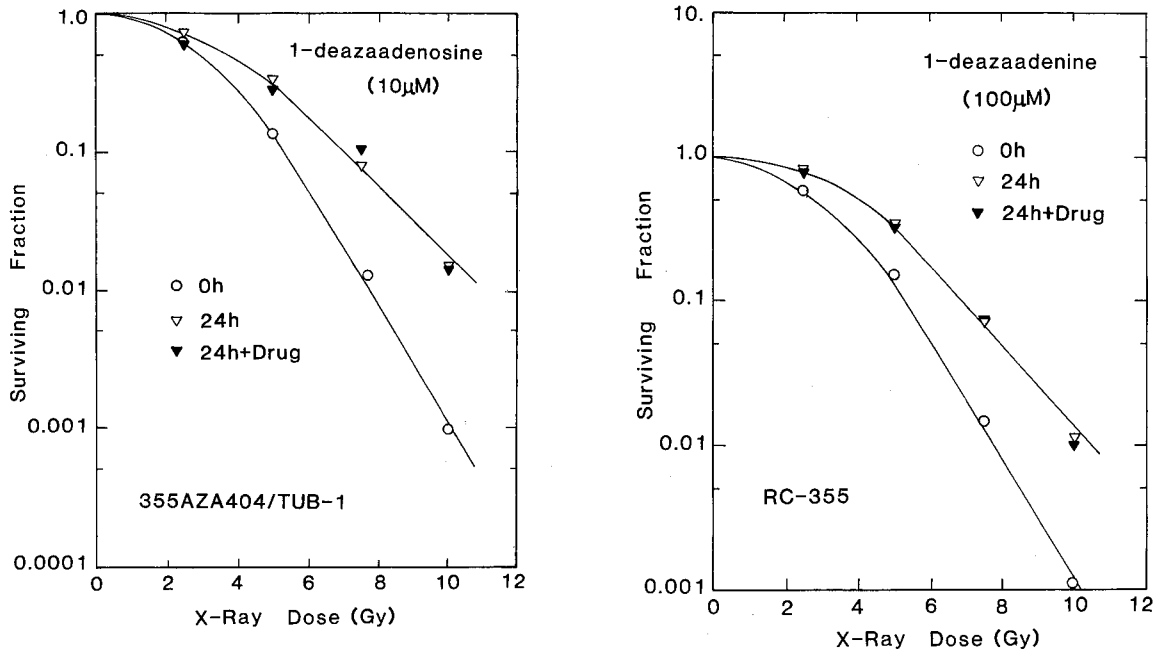


Fig. 3 The effect of C¹-Ado on the X-irradiated plateau-phase cells lacking adenosine kinase activity (355AZA404/TUB-1). b) The effect of 1-deazaadenine on the survival curves of X-irradiated RC-355 cells in plateau-phase. (○), immediate plating; (▽), delayed plating (24 h); (▼), delayed plating plus drugs.

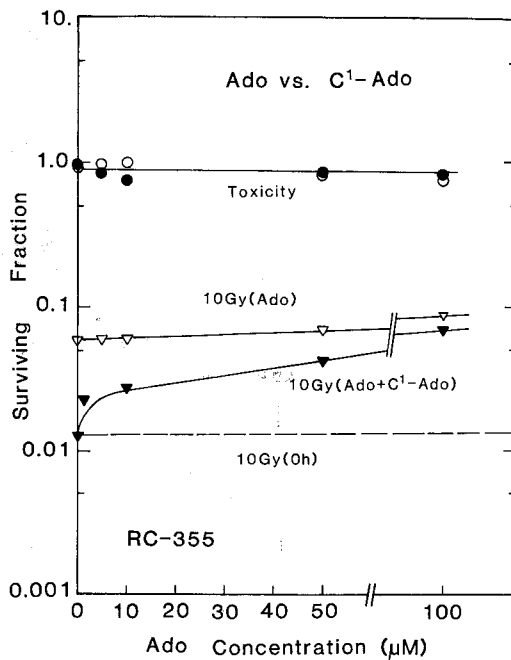


Fig. 4 The competitive effect of adenosine on the PLDR inhibition of C¹-Ado.

The plateau-phase RC-355 cells were exposed to 10 Gy of X-rays and incubated for 24 h with both 10 µM C¹-Ado and Ado at the various concentrations (▼). The survival for the cells treated with Ado only is also shown (▽). The X-ray survival was corrected for the cytotoxicity observed when treated Ado only (○) and both Ado and C¹-Ado (●). Broken line depicts the survival level of the cells plated without repair incubation.

存在下で24時間処理した。アデノシン単独では、生存率は変化なく、PLDRに対する影響は認められなかった。両薬剤を同時に処理した場合では、C¹-AdoのPLDR抑制作用は、共存するアデノシンの濃度の増加

につれて減少した。C¹-AdoによるPLDR抑制作用は100 µMのアデノシン存在により阻止され、その結果、ほぼ完全なPLDRが認められた。

3・4 デアザアデノシンの細胞内ヌクレオチドプールに対する効果

3・4・1 対数増殖期の RC-355 細胞内におけるデアザアデノシンの代謝.

プラトー期の細胞のヌクレオチドプールは小さいので、先ず対数増殖期の細胞を用いて C^1 -Ado および C^7 -Ado の細胞内代謝を調べた。Fig. 5b に示すように、対数増殖期の細胞の酸可溶性分画では、UTP, CTP, ATP および GTP のピークが、およそ 48, 51, 58 および 65 分にみられる。ピークの同定は、各ヌクレオチド

3 リン酸のスタンダードを用いて行った。50 μ M の C^1 - および C^7 -Ado で 1 時間処理した場合、新たなピーク (矢印) がそれぞれ 55.4 分および 52.5 分に出現した (Fig. 5a, c)。これらは C^1 -ATP および C^7 -ATP と対応し、後者の量は前者の約 1.7 倍であった。対照に比し、アデノシン 3 リン酸 (ATP) の濃度は減少しており、特に C^7 -Ado で処理した場合の方が顕著であった。

3・4・2 プラトー期の RC-355 細胞内におけるデアザアデノシンの代謝

プラトー期の RC-355 細胞においても、対数増殖期におけると同様な結果が得られた。プラトー期の細胞は、対数増殖期の細胞に比べてヌクレオチドプールが小さい (Fig. 6b)。Fig. 6a および 6c に示すように、 C^1 -Ado

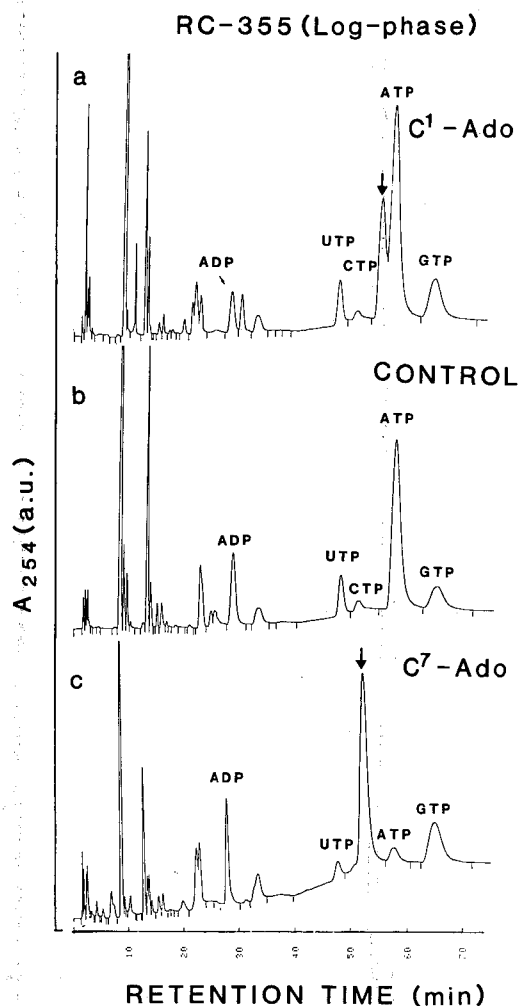


Fig. 5 HPLC analysis of the nucleotides of the log-phase RC-355 cells treated with deazaadenosines.

Acid soluble extracts from log-phase cells were analyzed by HPLC. a) 50 μ M C^1 -Ado (1 h), b) control, c) 50 μ M C^7 -Ado (1 h). The arrows indicate C^1 -ATP and C^7 -ATP, respectively.

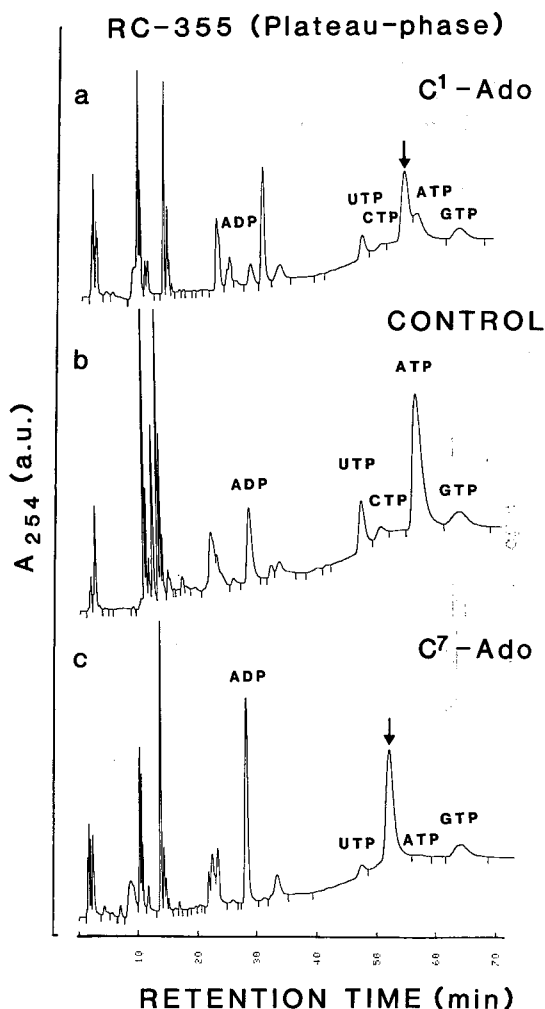


Fig. 6 HPLC analysis of the nucleotides of RC-355 cells treated with deazaadenosines in plateau-phase. a) 50 μ M C^1 -Ado (1 h), b) control, c) 50 μ M C^7 -Ado (1 h).

および C^7 -Ado 存在下での ATP プールの減少は、対数増殖期の細胞に比べてより著しかった。

3.4.3 AK 欠損細胞におけるデアザアデノシンの代謝.

同様の処理を対数増殖期の 355AZA404/TUB-1 細胞に対して行った. C^1 -Ado, C^7 -Ado いずれの薬剤で処理しても、デアザアデノシンヌクレオチドのピークの出現も、他のヌクレオチド 3 リン酸プールへの影響も認められなかった。

3.4.4 デアザアデノシン処理によるヌクレオチド 3 リン酸量の変化

プラトー期の細胞ではヌクレオチドプールが小さいので、対数増殖期の RC-355 細胞を用いて、 C^1 -Ado および C^7 -Ado 処理 (1 時間) による細胞内ヌクレオチド 3 リン酸 (NTP) プールに対する影響を調べた. Fig. 7a と b に、全体の NTP 量に対する各ヌクレオチドの量を百分率で示した. 調べた濃度範囲 (0-50 μ M) 内では、UTP, GTP の比率は変化なく、ATP のそれはデアザアデノシン濃度に依存して減少し、一方デアザ ATP は増加した. ATP とデアザ ATP の和は、ほぼ一定であった. C^7 -Ado についても同様の傾向が認められた。

3.5 FCM による C^1 -Ado の細胞周期の検討.

対数増殖期およびプラトー期の RC-355 細胞を、10 および 50 μ M の C^1 -Ado で処理し、その後 24 時間まで経時的に細胞周期に対する影響について検討した. これらの濃度で 1 時間処理した場合、対数増殖期の細胞に

おける 3 H-thymidine の取込はそれぞれ対照の 75% および 1% であった. Fig. 8 に高濃度 (50 μ M) 処理の結果を示す. この濃度では、細胞内の ATP プールは、無処理時の約 35% に低下している (Fig. 7a) が、細胞周期の分布は対照に比し変化がなかった. また低濃度 (10 μ M) で処理した場合においても同様の結果が得られた。

4 考 察

電離放射線によって生ずる細胞の損傷は、致死損傷 (lethal damage), 亜致死損傷 (sublethal damage) および潜在的致死損傷 (potentially lethal damage; PLD) に分類される⁴⁰⁻⁴². PLD は本来致死損傷であるが、照射後の条件によりその発現や修復が決定される. PLD 修復 (PLDR) の研究の多くは、その発見以来¹⁾, in vitro 腫瘍モデルのひとつであるプラトー期の細胞系を用いて行われてきた⁵⁾.

高速粒子放射線による治療では、癌細胞の PLDR はあまり起らない⁴²⁾ が、汎用されている低 LET (linear energy transfer) 放射線による治療では、この克服は治療成績の向上を期する上で重要であると考えられる. そのため、PLDR 抑制作用を示す薬剤の研究も、近年盛んになりつつある^{11-13,15,43-46)}.

これまで PLDR 抑制作用を示すアデノシン誘導体については①細胞内メチル化を抑制すること²³⁻²⁶⁾, ②抗ウイルス作用を有すること⁴⁷⁻⁴⁹⁾ および③リン酸化されること^{20,50)} が知られている. もちいたデアザ化合物は、

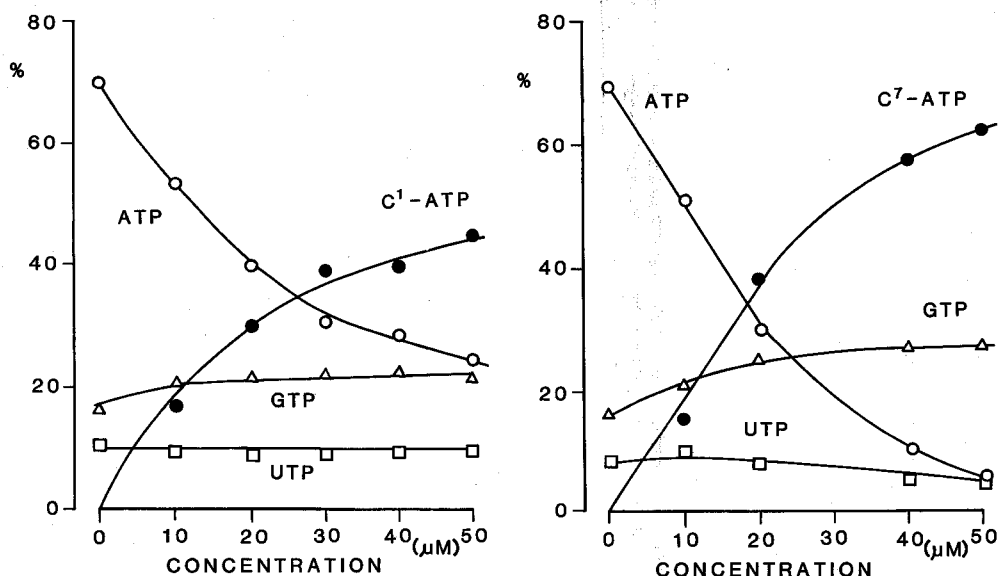


Fig. 7 Relative ratio of nucleotide triphosphates in log-phase RC-355 cells treated with C^1 -Ado (a) and C^7 -Ado (b) for 1h at the drug concentrations indicated.

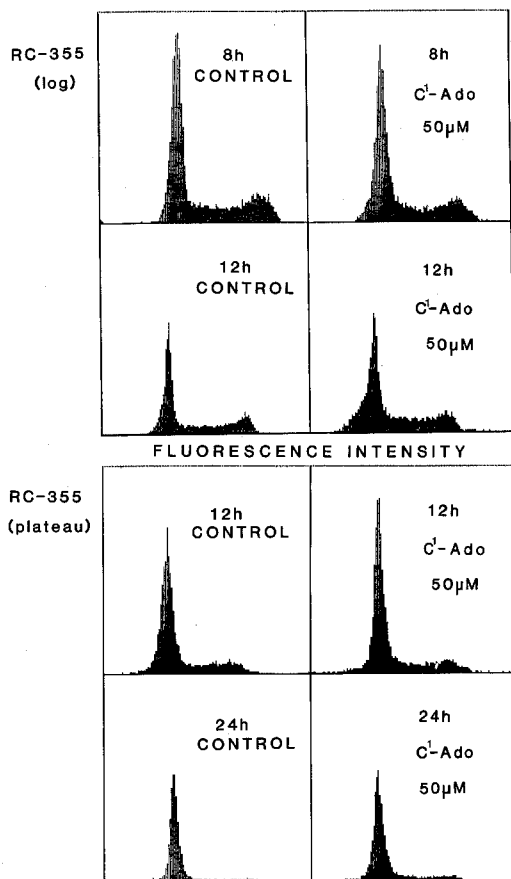


Fig. 8 DNA histogram of RC-355 cells treated with $50 \mu\text{M}$ $\text{C}^1\text{-Ado}$ for 1 hr in the log- and plateau-phase. The cells were analyzed their DNA content after the incubation periods indicated in the figure. The relative cell numbers (ordinates) are shown as a function of relative DNA content (fluorescence intensity).

このうち①および②の作用を有する。③については、 $\text{C}^7\text{-Ado}$ はリン酸化を受け、 $\text{C}^3\text{-Ado}$ はリン酸化されないことが知られており、 $\text{C}^1\text{-Ado}$ については不明である³¹⁻³⁴⁾。

報告されている PLDR 抑制作用をもつアデノシン誘導体である $9\text{-}\beta\text{-D-arabinofuranosyl adenine}$ (ara-A) や $3'\text{-deoxyadenosine}$ (cordycepin) には adenosyl homocysteinease 阻害作用が知られている。したがってこれらの作用間の関係を調べることも本研究の目的のひとつであった。しかしながら用いた薬剤の中で、もっとも強力な細胞内メチル化抑制作用を有する $\text{C}^3\text{-Ado}$ が、PLDR に対していかなる効果も示さないことより、二つの作用の間には関係がないことが分かった。

今回の研究において、 $\text{C}^1\text{-Ado}$ 及び $\text{C}^7\text{-Ado}$ に強い

PLDR 抑制作用が認められた (Fig. 2a, b)。Fig. 3 に示したように、アデノシンキナーゼ (AK) 欠損株においては、 $\text{C}^1\text{-Ado}$ の PLDR 抑制作用は認められず、また RC-355 細胞における $\text{C}^1\text{-Ado}$ の作用は AK の本来の基質であるアデノシンによって競合される (Fig. 4)。これらのことより、 $\text{C}^1\text{-Ado}$ の PLDR 抑制作用には、先ず細胞内で AK によってリン酸化されることが必須であると結論される。

細胞内に取込まれた $\text{C}^1\text{-Ado}$ が、リン酸化されて生成された $\text{C}^1\text{-AMP}$ は、HPLC を用いての実験の結果 (Fig. 5a, 6a) より、 $\text{C}^1\text{-ATP}$ まで代謝されている事がわかった。我々の用いた測定条件では、ATP と dATP を分離することはできないので、 $\text{C}^1\text{-ATP}$ および $\text{C}^1\text{-dATP}$ の生合成の有無または量比については不明である。しかし、一般に dATP の細胞内プールは、ATP のそれに比べて小さいので^{15,51,52)}、仮に $\text{C}^1\text{-dATP}$ が存在するとしても、量的にはわずかであると推察される。

Fig. 7a および 7b に示すように、対数増殖期の細胞内の C^1 -および $\text{C}^7\text{-ATP}$ の濃度は、加えたデアザアデノシンの濃度に依存して増加し、一方 ATP 濃度は、これに反比例して減少した。したがって、これらの誘導体の作用を考える時、デアザヌクレオチドそのものによるものと、正常 ATP プールの低下による間接的なものとの双方について考える必要がある。しかしながら、それぞれの薬剤が PLDR 抑制作用を示すような濃度においては、NTP プールに対する影響も、核酸合成に対するそれも少なかった。この結果は、Cantoni らの報告⁵³⁾ と一致する。 $2'\text{-deoxyadenosine}$ ⁵⁴⁾、 $5\text{-fluorodeoxyuridine}$ ⁵⁵⁾ および $2\text{-chlorodeoxyadenosine}$ ⁵¹⁾ 等の放射線増感作用やデオキシヌクレオチドの pool imbalance を引き起こすような薬剤では、その結果として、いずれも DNA 合成の抑制が報告されている。しかしながら Fig. 7a にみられるように、プラトー期のみならず対数増殖期においても、DNA 合成を抑制する濃度の $\text{C}^1\text{-Ado}$ 処理によっても、各ヌクレオチド 3 リン酸の量比に変化は認められない。このことは $\text{C}^1\text{-Ado}$ が pool imbalance を引き起こすような薬剤とは異なった機序により働くことを示唆する。また Fig. 8 に示したように、DNA 合成を阻害する濃度の $\text{C}^1\text{-Ado}$ を加えても S 期の細胞の蓄積がみられず、この薬剤は S 期に特異的ではなく、細胞周期の各期の細胞に作用して、周期の進行を妨げることが考えられる。 $\text{C}^1\text{-Ado}$ の PLDR 抑制作用の解除のために、10 倍の濃度のアデノシンの添加が必要であり (Fig. 4)、また Fig. 5a および 6a に示したように、 $\text{C}^1\text{-Ado}$ がヌクレオチド 3 リン酸 ($\text{C}^1\text{-ATP}$)

に逆代謝されたことは、 C^1 -Ado およびその代謝産物が細胞内の諸酵素の基質として、正常のヌクレオシドやヌクレオチドと競合している可能性を示唆する。

ara-A には DNA polymerase α および β の阻害作用が知られており⁵⁰⁾、これらの酵素は DNA 修復に重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら cordycepin や C^1 -および C^7 -Ado にはこの作用は知られておらず、PLDR 阻害作用との関連は不明である。

ara-A^{56,57)}、cordycepin⁵⁸⁾ および C^7 -Ado^{33,34)} は、いずれも DNA に取込まれることが知られている。この取込みは放射線損傷の修復合成の際にも起こることが考えられる。またこの際取込まれた誘導体が、その細胞毒性を発揮するのと同一の機構で細胞死を引き起こすことは十分にあり得ることである。このように PLDR 抑制作用を示す薬剤は、 C^1 -および C^7 -Ado も含めて必ず細胞内リン酸化を受けることが PLDR 抑制作用に必須であることから、これらの薬剤の間に共通する作用機構の存在を示唆すると考えられる。

ara-A^{17,20)} および cordycepin¹²⁾ は、生体内においてアデノシンデアミナーゼ (AD) により急速に脱アミノ化される。例えば X 線照射された培養細胞における PLDR は、cordycepin 投与初期には抑制されるものの、この薬剤の脱アミノ化に伴い発現するため、長時間の後には完全な回復が起こる¹²⁾。このため AD 阻害剤の併用による臨床応用の可能性について検討がなされた^{12,20-22)} が、阻害剤による生体中の AD 不活性化は不完全であること^{16,20-22)} が分った。これに対して C^1 -および C^7 -Ado は、PLDR をほぼ完全に抑制し、かつこの作用は長時間(24 時間)にわたって安定であった(Fig. 2a, b)。したがって C^1 -および C^7 -Ado がそれぞれ AD 阻害作用および抵抗性を有することは、治療への応用を考える場合、非常に有利な点である。

5 結 論

1) 検討した 3 種のデアザアデノシンのうち、 C^1 -および C^7 -Ado に、PLDR 抑制作用を認めた。これらは、細胞内でリン酸化されることにより、PLDR 抑制作用を発揮する。

2) C^1 -Ado はアデノシンデアミナーゼに抵抗性であり、細胞毒性の示さない濃度で PLDR を完全に抑制し、この抑制作用は 24 時間にわたって安定であった。

3) 強力な細胞内メチル化抑制剤である C^3 -Ado は PLDR 抑制作用を示さず、これらの作用の間には直接の関係はなかった。

4) HPLC 法により C^1 -および C^7 -Ado は 3 リン酸に

まで、代謝されていることが分った。またこの時の各ヌクレオチドの量比に変化がなく、これらが細胞内のアデノシン代謝酵素について生理的なヌクレオシドやヌクレオチドと競合している可能性が示唆された。

5) 核酸合成を抑制する濃度の C^1 -Ado 処理によっても、細胞周期のパラメーターに、変化は認められなかったもので、 C^1 -Ado が細胞周期の各期に作用して周期の進行を妨げることが示唆された。

6) 以上の結果より、 C^1 -および C^7 -Ado は、生体への応用可能な X 線 PLDR 阻害剤として期待されるものと考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲頂きました本学放射線医学講座、森田和夫教授に深甚なる謝意を表します。貴重な試薬を供与下さり、御助言頂いた北海道大学薬学部伊藤恵夫助教授、並びに獣医学部桑原幹典助教授に深謝致します。研究に際し、御教示、御協力頂きました小祝聰一郎講師はじめ教室員各位に感謝致します。本研究は文部省科学研究費の補助により行われた。

文 献

- 1) Phillips, R. A. and Tolmach, L. J.: Repair of potentially lethal damage in X-irradiated HeLa cells. *Radiat. Res.* **29**, 413-432 (1966).
- 2) Belli, J. A. and Shelton, M.: Potentially lethal radiation damage: Repair by mammalian cells in culture. *Science* **165**, 409-420 (1969).
- 3) Raaphorst, G. P. and Dewey, W. C.: Fixation of potentially lethal radiation damage by postirradiation exposure of Chinese hamster cells to 0.5 M or 1.5 M NaCl solution. *Int. J. Radiat. Biol.* **36**, 303-315 (1979).
- 4) Utsumi, H. and Elkind, M. M.: Potentially lethal damage: Quantitative differences between ionizing radiation and non-ionizing radiation and implications for 'single-hit' killing. *Int. J. Radiat. Biol.* **35**, 373-380 (1979).
- 5) Hahn, G. M. and Little, J. B.: Plateau-phase cultures mammalian cells: An *in vitro* model for human cancer. *Curr. Top. Radiat. Res. Q.* **8**, 39-83 (1972).
- 6) Evans, H. H. and Horng, M.: The Repair of potentially lethal damage and sublethal damage in strains of mouse L5178Y lymphoma cells differing in radiation sensitivity. *Radiat. Res.*

- 113, 183-190 (1988).
- 7) Kapiszewska, M. and Lange, C.S.: The effect of reduced temperature and/or starvation conditions on the radiosensitivity and repair of potentially lethal damage and sublethal damage in L5178Y-R and L5178Y-S cells. **Radiat. Res.** **113**, 458-472 (1988).
 - 8) Little, J. B., Hahn, G. M., Frindel, E. and Tubiana, M.: Repair of potentially lethal radiation damage *in vitro* and *in vivo*. **Radiology** **106**, 689-694 (1973).
 - 9) Raymond, U., Nakatsugawa, S., Takahashi, M., Ono, K., Abe, M., Kumar, A., Nagata, H. and Sugahara, T.: The chemical inhibition of PLDR (potentially lethal damage repair) *in vitro* and *in vivo* in cancer therapy. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.** **8**, 457-460 (1981).
 - 10) Busse, P. M., Bose, S. K., Jones, R. W. and Tolmach, L. J.: The action of caffeine on X-irradiated HeLa cells. II. Synergistic lethality. **Radiat. Res.** **71**, 666-677 (1977).
 - 11) Iliakins, G.: Effect of β -arabinofuranosyladenine on the growth and repair of potentially lethal damage in Ehrlich ascites tumor cells. **Radiat. Res.** **83**, 537-552 (1980).
 - 12) Nakatsugawa, S. and Sugahara, T.: Inhibition of X-ray induced potentially lethal damage (PLD) repair by cordycepin (3'-deoxyadenosine) and enhancement of its action by 2'-deoxycoformycin in Chinese hamster cells in the stationary phase *in vitro*. **Radiat. Res.** **84**, 265-275 (1980).
 - 13) Ben-Hur, E.: Enhanced radiation-induced killing of hamster cells by dideoxythymidine. **Radiat. Res.** **88**, 155-164 (1981).
 - 14) Iliakis, G., Pantelias, G. E. and Seamer, R.: Effect of arabinofuranosyladenine on radiation-induced chromosome damage in plateau-phase CHO cells measured by premature chromosome condensation: Implications for repair and fixation of α -PLD. **Radiat. Res.** **114**, 361-378 (1988).
 - 15) Hiraoka, W., Tanabe, K., Kuwabara, M., Sato, F., Matsuda, A. and Ueda, T.: Metabolic effects of 3'-deoxyadenosine (cordycepin) and 2-halo-3'-deoxyadenosine on repair of X-ray-induced potentially lethal damage in Chinese hamster V79 cells. **Radiat. Res.** **114**, 231-239 (1988).
 - 16) Hutton, J. J., Von Hoff, D. D., Kuhn, J. K., Phillips, J., Hersh, M. and Clark, G.: Phase I Clinical Investigation of 9- β -D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine 5'-monophosphate (NSC 312887), a new purine antimetabolite. **Cancer Res.** **44**, 4183-4186 (1984).
 - 17) Plunkett, W., Chubb, S., Alexander, L. and Montgomery, A.: Comparison of the toxicity and metabolism of 9- β -D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine and 9- β -D-arabinofuranosyladenine in human lymphoblastoid cells. **Cancer Res.** **40**, 2349-2355 (1980).
 - 18) Shewach, D. S. and Plukett, W.: Effect of 2'-deoxycoformycin on the inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis by 9- β -D-arabinofuranosyladenine 5'-triphosphate. **Biochem. Pharmacol.** **31**, 2103-2109 (1982).
 - 19) LePage, G. A., Khaliq, A. and Gottlieb, J. A.: Studies of 9- β -D-arabinofuranosyladenine in man. **Drug Metab. Dispos.** **1**, 756-759 (1973).
 - 20) Plukett, W., Alexander, L., Chubb, S. and Loo, T. L.: Comparison of the activity of 2'-deoxycoformycin and erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine *in vivo*. **Biochem. Pharmacol.** **28**, 201-206 (1978).
 - 21) Trotta, P. P., Ahland, M. P., Brown, G. F. and Balis, M. E.: Studies on the effects of enzyme inhibitors on mouse adenosine deaminase. **Mol. Pharmacol.** **14**, 199-209 (1978).
 - 22) Trotta, P. P., Tedde, A. and Balis, M. E.: *In vivo* effects of deoxycoformycin on mouse adenosine deaminase and nucleoside phosphorylase. **Proc. Am. Assoc. Cancer Res.** **20**, 284 (1979).
 - 23) Schanche, J., Schanche, T. and Ueland, M.: Inhibition of phospholipid methylation in isolated rat hepatocytes by analogues of adenosine and S-adenosylhomocysteine. **Biochim. Biophys. Acta** **721**, 399-407 (1982).
 - 24) Woodcock, D. M., Adams, J. K., Allan, R. G. and Cooper, I. A.: Effect of several inhibitors of enzymatic DNA methylation on the *in vivo* methylation of different classes of DNA sequences in a cultured human cell line. **Nucleic Acids Res.** **11**, 489-499 (1983).
 - 25) Ishikura, T., Nakamura, H., Sugawara, T., Itoh, T., Nomura, A. and Mizuno, Y.: Inhibition of S-adenosylhomocysteine hydrolase by purine nucleoside analogues. **Nucleic Acids Res. Symp. Ser.** **12**, 119-122 (1983).
 - 26) Ueland, P. M.: Pharmacological and biochemical aspects of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase. **Pharmacol. Rev.** **34**, 223-253 (1982).
 - 27) Lupidi, G., Riva, F., Cristalli, G. and Grifantini,

- M.: Inhibition of adenosine deaminase by deazaderivatives of adenosine and purine riboside. **Ital. J. Biochem.** **31**, 396-403 (1982).
- 28) Ikehara, M. and Fukui, T.: Studies of nucleosides and nucleotides. LVIII. Deamination of adenosine analogs with calf intestine adenosine deaminase. **Biochim. Biophys. Acta** **338**, 512-519 (1974).
- 29) De Clercq, E. and Montgomery, J. A.: Broad-spectrum antiviral activity of the carbocyclic analog of 3-deazaadenosine. **Antiviral Res.** **3**, 17-24 (1983).
- 30) Itoh, T., Ishihara, T. and Mizuno, Y.: Studies on the chemical synthesis of potential antimetabolites. XXXIV. Apparent discrepancy among reported proton nuclear magnetic resonance spectra of 3-deazaadenosine is actually a reflection of a difference in molecular species. **Chem. Pharm. Bull.** **31**, 4130-4134 (1983).
- 31) Rabin, M. S. and Gottesman, M. M.: High frequency of mutation to tubercidin resistance in CHO cells. **Somat. Cell Genet.** **5**, 571-583 (1979).
- 32) Gupta, R. S. and Siminovitch, L.: Genetic and biochemical studies with the adenosine analogs toyocamycin and tubercidin: Mutation at the adenosine kinase locus in Chinese hamster cells. **Somat. Cell Genet.** **4**, 715-735 (1978).
- 33) Acs, G. and Reich, E.: Tubercidin and related pyrrolopyrimidine antibiotics, In: Gottlieb, D. and Shaw, P. D.: **Antibiotics** **1**, 494-498, Springer-Verlag, New York (1967).
- 34) Suhadolnik, R. J.: Pyrrolopyrimidine nucleotides, In: Suhadolnik, R. J.: **Nucleoside Antibiotics**. 298-353, Wiley-Interscience, New York (1970).
- 35) Kubo, K., Koiwai, S. and Morita, K.: The effect of caffeine on X-ray repair of radioresistant HeLa cells. **J. Radiat. Res.** **26**, 361-371 (1985).
- 36) Khym, J. X.: An analytical system for rapid separation of tissue nucleotides at low pressures on conventional anion exchangers. **Clin. Chem.** **21**, 1245-1252 (1975).
- 37) Bennett, L. L., Allan, P. W., Rose, L. M., Comber, R. N. and Secrist III, J. A.: Differences in the metabolism and metabolic effects of the carbocyclic adenosine analogs, neplanocin A and aristeromycin. **Mol. Pharmacol.** **29**, 383-390 (1986).
- 38) Hartwick, R. A. and Brown, P. R.: The performance of microparticle chemically-bonded anion-exchange resins in the analysis of nucleotides. **J. Chromatogr.** **112**, 651-662 (1975).
- 39) Plagemann, P. G. W. and Wohlhueter, R. M.: Adenosine metabolism in wild-type and enzyme-deficient variants of Chinese hamster ovary and Novikoff rat hepatoma cells. **J. Cell. Physiol.** **116**, 236-246 (1983).
- 40) 森田皓三: 化学療法と放射線療法の併用療法. 田坂皓他編集. **放射線医学大系** **30**, 212-227, 中山書店, 東京 (1983).
- 41) Hall, E. J.: In: **Radiobiology for the radiologist**. 129-169, Harper & Row, Maryland (1978).
- 42) 恒元 博: 粒子線治療の現況, 田坂 皓他編. **放射線医学大系** **30**, 186-195, 中山書店, 東京 (1983).
- 43) Raaphorst, G. P. and Azzam, E. I.: Fixation of potentially lethal radiation damage in Chinese hamster cells by anisotonic solution, polyamines, and DMSO. **Radiat. Res.** **86**, 52-66 (1981).
- 44) Little, J. B. and Dahlberg, W. K.: Sensitization of noncycling human diploid cells to X-irradiation by pretreatment with 9- β -D-arabinofuranosyladenine. **Cancer Res.** **49**, 838-842 (1989).
- 45) Shewach, D. S. and Plunkett, W.: Cellular retention of 9- β -D-arabinofuranosyladenine 5'-triphosphate and the pattern of recovery of DNA synthesis in Chinese hamster ovary cells. **Cancer Res.** **46**, 1581-1584 (1986).
- 46) Cass, C. E., Selner, M. and Phillips, J. R.: Resistance to 9- β -D-arabinofuranosyladenine in cultured leukemia L1210 cells. **Cancer Res.** **43**, 4791-4798 (1983).
- 47) Whitley, R. J., Ch'ien, L. T., Dolin, R., Galasso, G. J. and Alford, C. A. and the collaborative study group: Adenine arabinoside therapy of herpes zoster in the immunosuppressed niad. **New Engl. J. Med.** **294**, 1193-1199 (1976).
- 48) Whitley, R. J., Soong, S., Dolin, R., Galasso, G. J., Ch'ien, L. T., Alford, C. A. and The Collaborative Study Group: Adenine arabinoside therapy of biopsy-proved herpes simplex encephalitis. **N. Engl. J. Med.** **297**, 289-294 (1977).
- 49) De Clercq, E.: Specific targets for antiviral drugs. **Biochem. J.** **205**, 1-13 (1982).
- 50) Saunders, P. P., Tan, M., Spindler, C. D., Robins, R. K. and Plunkett, W.: 3-deazaguanosine is metabolized to the triphosphate derivative in Chinese hamster cells deficient in hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase. **J. Biol. Chem.** **261**, 6416-6422 (1986).
- 51) Hirota, Y., Yoshioka, A., Tanaka, S., Watanabe, K., Otani, T., Minowada, J., Matsuda, A., Ueda,

- T. and Wataya, Y.: Imbalance of deoxyribonucleoside triphosphates, DNA double-strand breaks, and cell death caused by 2-chlorodeoxyadenosine in mouse FM3A cells. **Cancer Res.** **49**, 915-919 (1989).
- 52) Tanaka, K., Yoshioka, A., Tanaka, S. and Wataya, Y.: An improved method for the quantitative determination of deoxyribonucleoside triphosphates in cell extracts. **Anal. Biochem.** **139**, 35-41 (1984).
- 53) Cantoni, O., Sestili, P., Balduini, W., Cristalli, G., Grifantini, M. and Cattabeni, F.: Inhibition of nucleic acids and protein synthesis by deazaadenosine derivatives.: A study on structure-activity relationships. **Pharmacol. Res. Commun.** **17**, 1087-1094 (1985).
- 54) Yoshioka, A., Tanaka, S., Hiraoka, O., Hirota, Y. and Wataya, Y.: Deoxyribonucleoside-triphosphate imbalance death: deoxyadenosine induced dNTP imbalance and DNA double strand breaks in mouse FM3A cells and the mechanism of cell death. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **146**, 258-264 (1987).
- 55) Yoshioka, A., Tanaka, S., Hiraoka, O., Hirota, Y., Koyama, Y., Ayusawa, D., Seno, T., Garrett, C. and Wataya, Y.: Deoxyribonucleoside triphosphate imbalance: 5-fluorodeoxyuridine-induced DNA double strand breaks in mouse FM3A cells and the mechanism of cell death. **J. Biol. Chem.** **262**, 8235-8241 (1987).
- 56) Muller, W. E. G., Rohde, H. J., Beyer, R., Maidhof, A., Lachmann, M., Taschner, H. and Zahn, R. K.: Mode of action of 9- β -D-arabinofuranosyladenine on the synthesis of DNA, RNA, and protein *in vivo* and *in vitro*. **Cancer Res.** **35**, 2160-2168 (1975).
- 57) Kufe, D. W., Major, P. P., Munroe, D., Egan, M. and Herrick, D.: Relationship between incorporation of 9- β -D-arabinofuranosyladenine in L1210 DNA and cytotoxicity. **Cancer Res.** **43**, 2000-2004 (1983).
- 58) Cory, J. G., Suhadolnik, R. J., Resnic, B. and Rich, M. A.: Incorporation of cordycepin (3'-deoxyadenosine) into ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid of human tumor cells. **Biochim. Biophys. Acta** **103**, 646-653 (1954).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学放射線医学講座 大久保 整